Istituto d'Igiene della R. Università di Palermo

INFLUENZA DEI GANGLI LINFATICI
NELLA PRODUZIONE DELL'IMMUNITÀ
VERSO LE MALATTIE INFETTIVE

RICERCHE SPERIMENTALI

DEI

Prof. L. MANFREDI e Dott. P. VIOLA

PALERMO
FRATELLI MARSALA - EDITORI
Via Parlamento - 56
1898

Istituto d'Igiene della R. Università di Palermo

INFLUENZA DEI GANGLI LINFATICI NELLA PRODUZIONE DELL'IMMUNITÀ VERSO LE MALATTIE INFETTIVE

RICERCHE SPERIMENTALI

DEI

Prof. L. MANFREDI e Dott. P. VIOLA

PALERMO
FRATELLI MARSALA - EDITORI
Via Parlamento - 56
1898

Dalle numerose ricerche del dottor G. PEREZ, eseguite in questo Istituto per suggerimento e con la guida di uno di noi, sul comportamento del sistema ganglionare linfatico rispetto ai microrganismi, è risultato che i gangli linfatici possiedono queste due importanti proprietà: 1. di trattenere nel loro stroma più o meno a lungo i microbi saprofiti o patogeni, che invadono l'organismo, tanto da contenerne un certo numero quasi sempre, anche nelle condizioni fisiologiche; 2. di determinare sui batteri patogeni, ai quali danno ricetto, un'attenuazione più o meno notevole della loro virulenza (1).

Stabilito quindi, in tal modo, che il sistema ganglionare linfatico costituisce uno tra i principali mezzi di difesa per l'organismo, sia nel tutelarlo contro le continue invasioni microbiche, mediante una azione quasi di arresto verso i batteri invasori, sia nell'esercitare più particolarmente in caso d'infezione avvenuta un valido aiuto a prò di esso, ricettando e attenuando nel proprio tessuto i batteri patogeni, rimane ad esaminare un terzo lato della questione: in qual modo, cioè, il detto sistema ganglionare si comporti nella immunizzazione dell'organismo contro gli agenti infettivi.

I risultati sperimentali ottenuti da PEREZ, nelle prime due parti del lavoro, che formarono oggetto delle sue ricerche, fanno convergere appunto il più vivo interesse su questa terza parte. Che cosa,

(1) *Parassitismo microbico latente nei gangli linfatici normali.* Annali d'igiene sperim. 1897, pag. 276.—*I gangli linfatici nelle infezioni,* Ibid. 1898 pag. 1. (Questa *Raccolta,* vol. III).

difatti, si verifica nell'organismo sotto l' influenza di questo parassitismo microbico latente nelle condizioni normali? Ê tale parassitismo un fatto indifferente, o non costituisce forse esso il substrato di quelle immunizzazioni, che si possono pur dire *latenti*, perchè continuamente e lentamente acquistate nel corso della vita senza pagarle a prezzo di alcuna malattia, ma quasi, come per effetto di un conflitto invisibile con gli agenti morbigeni? È, d'altra parte, dato il caso di una infezione superata, il microbismo specifico latente che segue a questa e si protrae più o meno a lungo nei soli gangli linfatici, e quivi subisce varie fasi fino alla soppressione della virulenza e poi della vita del germe specifico, non è probabile forse che abbia una gran parte nella produzione di quell' immunità, che segue alla guarigione del processo infettivo?

Mossi da tali considerazioni, abbiamo preso a studiare la possibilità, il meccanismo e gli effetti della *immunizzazione per mezzo del sistema ganglionare linfatico,* verso due importanti batteri patogeni: l'uno ad azione eminentemente infettiva, il *bacillo del carbonchio*, l'altro ad azione prevalentemente tossica, il *bacillo del tifo.* Abbiamo aggiunto altresì a queste alcune poche ricerche fatte con la *tossina difterica.*

A questo scopo era importante adottare un modo d'inoculazione del virus, che ne determinasse la immediata ed esclusiva penetrazione nella rete vasale linfatica, e indi nei gangli, evitando la possibilità di una penetrazione iniziale in altri tessuti e sopratutto nel circolo sanguigno. Tra i modi a ciò rispondenti erano quelli, studiati anche da Perez, della *introduzione del virus a traverso la cute integra* mercè lo sfregamento, oppure della *inoculazione nella camera anteriore dell'occhio* a traverso la cornea; per entrambo le quali vie il Perez dimostrò, che le piccole dosi di batteri anche molto virulenti, come il carbonchio, per animali anche molto recettivi, come le cavie o i conigli, possono penetrare nell'organismo soffermandosi più o meno tempo nei gangli linfatici, senza produrre l'infezione.

Abbiamo preferito la via della camera anteriore dell'occhio, come quella che oltre ad una maggiore facilità ed esattezza di operazione, si presta anche meglio per una determinazione possibilmente precisa della quantità del virus da inoculare, rendendo così le esperienze sistematiche e comparabili fra loro.

La camera anteriore dell'occhio si può in effetti considerare come una grande lacuna linfatica, che trovasi in comunicazione diretta esclusivamente coi vasi linfatici della regione, ed è facilmente acces-

sibile dall'esterno a traverso la membrana corneale, priva di vasi sanguigni; per modo che riesce agevole limitare per tale via la penetrazione del virus al solo sistema linfatico. Tutto sta a non ferire i vasi sanguigni delle vicinanze. Con un po' di esercizio, si raggiunge pienamente lo scopo.

La tecnica da noi usata era la seguente.

TECNICA.

Immobilizzato l'animale sul tavolo da operazione, si fa un abbondante lavaggio del sacco congiuntivale con acqua sterilizzata, indi mercè adatta pressione esercitata con le dita lungo il bordo palpebrale, si fa protundere il bulbo dell'orbita e mantenendolo in tale posizione con l'aiuto di due strisce di cotone idrofilo, si punge la cornea con finissimo ago-cannula lievemente arroventato, e si penetra nella camera anteriore evitando di approfondire molto l'ago, per non ferire menomamente nè l'iride, né la pupilla. Aspettasi che venga fuori l'umor acqueo, il quale esce per la ferita corneale, senza bisogno di ritirare l'ago della siringa; e subito dopo si inietta il liquido di coltura, che può essere contenuto al massimo da ciascuna delle camere, nella quantità di 0,2-0,3 cc. nei conigli e 0,1-0,2 cc. nelle cavie.

Operando in tal modo si ha la maggiore probabilità di non ferire la congiuntiva; la quale pure, talvolta, anche senza che l'operatore se ne accorga, può venir lesa, o per lieve movimento dell'animale, o per spostamento del bulbo, oppure per un previo stato infiammatorio della stessa; ed allora gli effetti locali consecutivi all'inoculazione (ad esempio la chemosi congiuntivale, la panoftalmite, ecc.), rivelano che si è battuto una falsa strada.

Per praticare gl'innesti dai gangli, abbiamo eseguito la stessa tecnica adottata da Perez e sottoposta da lui ai più rigorosi controlli.

Eccola riassunta qui in breve.

Appena morto l'animale, o ucciso con un colpo alla nuca, si pratica un'accurata disinfezione della pelle, e con strumenti sterilizzati si mettono successivamente allo scoperto le regioni cervicale, ascellare e inguinale, avendo cura di operare in un ambiente tranquillo. Dopo aver lavato la regione già scoperta con soluzione sterilizzata di cloruro sodico a titolo fisiologico, si sgusciano i gangli dal tessuto cellulo adiposo che li involge. Si sottopongono a ripetuti lavaggi in diverse provette contenenti soluzione fisiologica di cloruro di sodio, per togliere qualche po' di sangue che si trovasse appiccicato alla superficie di essi, e infine si depositano sulla parete interna di provette sterilizzate. Quivi con forbice sterilizzata e usando di ovvie precauzioni, si tagliuzzano finamente, prelevando in ultimo dal materiale così ridotto in poltiglia, parecchie anse che vengono insemenzate in agar per farne delle colture isolanti.

Dopo avere così presi gli innesti dai gangli sottoiodei, carotidei, ascellari ed inguinali, si apre l'addome per eseguire con la tecnica accennata anche degli innesti dai gangli mesenterici.

Furono sempre fatti, inoltre, innesti di controllo dal peritoneo, dalla milza e dal sangue degli animali in esperimento, con la tecnica generalmente adottata per questi casi.

I. — Immunizzazione dei conigli e delle cavie al carbonchio.

Le prime esperienze da noi fatte per orientarci in proposito, con l'inoculazione di colture di carbonchio nella camera anteriore dell'occhio di conigli e di cavie, confermarono il fatto interessante già notato da Perez, che, mentre le dosi modiche del virus uccidono gli animali con notevole ritardo , le dosi molto piccole invece non producono nè la morte, nè alcun disturbo apprezzabile; quantunque anche in questo secondo caso sia dimostrabile la presenza del bacillo carbonchioso in vari punti dell'organismo.

Questo fatto, tanto più notevole in quanto che era finora risaputo che l' inoculazione (per qualunque altra via) anche di quantità assolutamente minime di bacilli del carbonchio bastasse per uccidere i conigli e sopratutto senza alcuna eccezione le cavie , dimostrava fin da principio come, in quanto a suscettibilità verso l'infezione carbonchiosa , il sistema linfatico dovesse reagire in maniera diversa da quella di tutti gli altri tessuti dell'economia.

Ciò posto, abbiamo creduto di dover tracciare per le nostre ricerche il seguente programma :

1. Determinare, nei conigli e nelle cavie, *la dose letale minima* di virus carbonchioso che si può introdurre per la camera anteriore dell'occhio.

2. Vedere se, con inoculazioni ripetute per la detta via di quantità progressivamente crescenti di virus , a cominciare da quantità non letali, si potesse rendere retrattari i detti animali all' azione di dosi letali ed anche poi all' introduzione del virus per la via sottocutanea.

3. Indagare, sugli animali inoculati con dosi letali e non letali e in quelli sottoposti alla immunizzazione il destino del virus introdotto nella camera anteriore, il cammino che esso fa, le modificazioni che eventualmente subisce, nonchè d'altra parte le possibili reazioni o i mutamenti originantisi nell' organismo sotto l' influenza di esso (potere battericida, chemiotassi, stato di nutrizione, ecc.).

Adoperammo come liquido d'inoculazione culture di carbonchio in brodo di 48 ore, sviluppate nel termostato a 37°. Queste culture provenivano dal sangue di una cavia inoculata con fili di seta sporiferi, preparati e conservati in laboratorio, la cui virulenza era tale da uccidere le cavie in 24-36 ore.

Per misurare con esattezza le piccole quantità del liquido di coltura da inoculare, ci siamo servito di apposite pipette di vetro a calibro molto ristretto e accuratamente graduate, in modo da avere escursioni relativamente ampie del liquido nell' istrumento misuratore. In tal modo si è potuto dosare con sufficiente facilità e precisione anche $\frac{1}{50}$ di cc. di brodocoltura, che è stata la più piccola quantità inoculata.

L'inoculazione nella camera anteriore si fa nel modo descritto innanzi. In quanto agli effetti locali consecutivi all'operazione, diciamo qui una volta per tutte quello che notammo qualunque sia stato il virus in esperimento. Dopo la prima inoculazione, essendo l'ago un po' arroventato, intorno al punto leso della cornea si formava un opacamento, dovuto ad un processo d'infiammazione reattiva del tessuto circostante.

Nei giorni consecutivi pure scomparendo il processo infiammatorio, restava in corrispondenza del punto leso una piccola macchia bianca, rappresentante il tessuto connettivo formatosi per la perdita di sostanza della cornea. Quasi contemporaneamente compariva spesso l'opacamento della lente cristallina, costituendosi una vera cataratta, da attribuirsi o al disturbo nutritivo immediato, od al trauma. Ripetendosi l' inoculazione nel medesimo occhio, si ripetevano gli stessi effetti, per cui l' opacamento della cornea si estendeva a quasi tutta la parte centrale con l'aspetto di un leucoma centrale. Nelle successive inoculazioni inoltre si avevano fenomeni reattivi da parte dell' iride, formandosi infine una iridite plastica, con sinecchie posteriori.

In alcuni casi però, quando la congiuntiva era previamente infiammata, in seguito alla seconda o terza puntura insorgeva un processo di panoftalmite con consecutiva formazione di microftalmo.

Ecco ora i risultati delle esperienze:

1. Determinazione della dose letale minima per la camera anteriore dell' occhio. — Sono raccolti nella seguente tabella i risultati ottenuti per le cavie ed i conigli. Non sono riportati, naturalmente, i casi nei quali vi fu qualche ferita accidentale della congiuntiva o dell'iride e quindi penetrazione del virus nel sangue.

TABELLA I.

Numero d'ordine	PESO dell'animale	QUANTITÀ di brodocoltura inoculata	ESITO
		A — CAVIE	
1ª	285	1/40 cc.	+ dopo 59 ore
2ª	302	»	» 95 »
3ª	294	»	» 84 »
4ª	345	»	» 116 »
5ª	320	»	» 94 »
6ª	374	»	» 128 »
7ª	610	»	» 115 »
8ª	590	»	» 127 »
9ª	550	»	» 139 »
10ª	210	»	» 93 »
11ª	254	»	» 70 »
12ª	260	»	» 120 »
13ª	265	»	» 122 »
14ª	235	»	» 101 »
15ª	501	»	» 108 »
16ª fino a 30ª	240-275	1|50 cc.	Tutte vive
		B — CONIGLI	
1º	1020	1/10 cc.	+ dopo 63 ore
2º	958	1/20 cc.	» 117 »
3º	843	»	» 113 »
4º	1020	»	» 114 »
5º	1095	»	» 90 »
6º fino a 16º	800-1500	1/30—1/40cc.	Tutti vivi

Esperienze di controllo furono fatte inoculando a vari conigli e cavie, *nel sottocutaneo*, dosi di carbonchio eguali a quelle usate nelle esperienze della tabella I, e si ebbe per risultato:

Conigli inoculati nel sottocutaneo.

con $\frac{1}{10}$ cc. . . . . morte dopo 48–58 ore

con $\frac{1}{30}$ cc. . . . . » 58-68 »

Cavie inoculate nel sottocutaneo.

con $\frac{1}{30}$ cc. . . . . morte dopo 44-60 ore

con $\frac{1}{40}$ cc. . . . . » 45-55 »

con $\frac{1}{50}$ cc. . . . . » 48-52 »

Inoltre dalla coltura in brodo di carbonchio di 48 ore, e con le dosi suddette, si fecero delle piastre per conoscere approssimativamente il numero dei bacilli contenuti in ciascuna dose. Come media di parecchie analisi si ebbe:

da $\frac{1}{50}$ cc. . . . . lo sviluppo di 290-334 colonie

da $\frac{1}{40}$ cc. . . . . . . » 392-425 »

da $\frac{1}{30}$ cc. . . . . . . » 456-585 »

da $\frac{1}{20}$ cc. . . . . . . » 620-684 »

Cosicchè risulta evidentemente da questa prima serie di esperienze, che, effettuandosi l'inoculazione del virus carbonchioso nella camera anteriore dell'occhio in conigli e cavie, si hanno *dosi non letali*, le quali cioè sono incapaci di produrre l'infezione, e *dosi letali minime*, che determinano la morte del maggior numero di animali solo con un ritardo più o meno notevole; dosi le quali, intanto, contengono ancora un discreto numero di bacilli, e inoculate per altra vià, uccidono senza fallo i detti animali con poco o nessun ritardo (1).

(1) Il Sobernheim (*Zeitsch. für Hygiene und Infectionsk*, 1897, XXV, 309-311) ha recentemente dimostrato che quando la coltura di carbonchio è molto virulenta, bastano *alcuni pochi germi* o *anche uno solo* (*nur einen oder höcsthens ganz vereinzelte lebensfähige Keime*) per produrre la morte così nelle cavie e nei topi, come nei conigli, quando l' inoculazione venga fatta nel sottocutaneo.

La *dose letale minima* della coltura di carbonchio da noi adoperata, rimane dunque fissata: per i conigli ad $\frac{1}{20}$ di cc., cioè *una goccia normale*; per le cavie ad $\frac{1}{40}$ di cc., cioè *mezza goccia normale*. Il peso dell'animale non pare che abbia in ciò una influenza apprezzabile.

2. Immunizzazione.—Stabiliti questi fatti, passammo a sperimentare l'effetto di inoculazioni ripetute nella stessa camera anteriore, con quantità progressivamente crescenti di virus, procedendo da dosi non letali a dosi una o più volte letali. Tra una inoculazione e l'altra si aspettava che l'animale fosse completamente ristabilito, e per questo più che l'andamento del peso del corpo, che non era un fattore apprezzabile (v. appresso), serviva di criterio e di norma l'esperienza fatta su altri animali a titolo di saggio. Si ottennero i risultati seguenti:

TABELLA II.

Inoculazioni ripetute con dosi crescenti di carbonchio nella camera anteriore

N. d'ordine	I INOCULAZIONE			II INOCULAZIONE			III INOCULAZIONE			IV INOCULAZIONE			OSSERVAZIONI
	Data	Peso dell'animale	Quantità di coltura	Data	Peso dell'animale	Quantità di coltura	Data	Peso dell'animale	Quantità di coltura	Data	Peso dell'animale	Quantità di coltura	
							A — CAVIE						
1ª	26 nov.	401	$^1/_{50}$ cc.	31 dic.	446	$^1/_{40}$ cc.	21 genn.	460	$^1/_{40}$ cc.	5 febbr.	475	$^1/_{20}$ cc.	
2ª	28 dic.	380	»	6 genn.	365	»	25 »	380	$^1/_{30}$ cc.	6 »	401	»	
3ª	22 nov.	325	»	»	300	»	28 »	310	»	8 »	315	»	Morta 96 ore dopo per ferita
4ª	14 genn.	265	»	29 »	330	$^1/_{30}$ cc.	9 febbr.	340	$^1/_{20}$ cc.	21 »	358	»	della congiuntiva.
5ª	5 febbr.	570	»	20 febbr.	560	$^1/_{40}$ cc.	21 marzo	540	$^1/_{30}$ cc.	1 aprile	557	»	
6ª	4 marzo	325	»	15 marzo	345	»	29 »	405	»	12 »	428	»	
7ª	9 marzo	320	»	21 »	360	»	1 aprile	415	»	16 »	424	»	
8ª	9 marzo	330	»	»	320	»	»	350	»	»	...	...	Morta 106 ore dopo per ferita
9ª	8 febbr.	515	»	18 febbr.	572	»	1 marzo	550	»	10 marzo	...	»	della congiuntiva.
							B — CONIGLI						
1°	21 dic.	1494	$^1/_{40}$ cc.	6 genn.	1500	$^1/_{20}$ cc.	21 genn.	1540	$^1/_{20}$ cc.	5 febbr.	1600	$^1/_{10}$ cc.	
2°	27 »	1625	»	15 »	1610	»	28 »	1635	»	15 »	1650	»	
3°	13 genn.	1060	»	29 »	1105	»	9 febbr.	1150	»	22 »	1200	»	
4°	»	1200	»	»	1495	»	»	1470	»	...	...	...	Morto 58 ore dopo per ferita
5°	18 »	1570	»	1 febbr.	1570	$^1/_{30}$ cc.	16 »	1655	»	27 »	1690	»	della congiuntiva.
6°	»	1005	»	»	895	»	»	1405	$^1/_{30}$ cc.	»	1520	»	
7°	22 »	800	»	5 »	845	$^1/_{20}$ cc	...	...	...	...	...	..	Morto 74 ore dopo per ferita
8°	19 marzo	1250	»	21 marzo	1260	$^1/_{30}$ cc.	1 aprile	1270	$^1/_{20}$ cc.	9 aprile	1274	»	della congiuntiva.
9°	»	980	»	28 »	1050	»	6 »	1040	»	15 »	1160	»	

Questi risultati dimostrano come si possa nei conigli e nelle cavie aumentare la relativa refrattarietà, di cui la camera anteriore dell'occhio è dotata verso il carbonchio, mediante inoculazioni ripetute di virus, fino al punto da *immunizzarla* contro dosi tali, che sarebbero sicuramente letali se inoculate per la stessa via in animali di controllo.

Si nota che già dopo una prima inoculazione fatta con dose non letale, l'animale può nella seconda inoculazione ricevere la dose minima letale, e poi nella 3ª e 4ª inoculazione delle dosi multiple di quest'ultima. Il tempo trascorso fra una inoculazione e l'altra ha oscillato, in media, fra 10 giorni ed un mese.

Quale era pertanto il significato da darsi a questo fatto della immunizzazione ottenuta per la camera anteriore dell'occhio, in animali come i conigli e le cavie, dei quali si sà l'estrema difficoltà pei primi e l'impossibilità pei secondi ad immunizzarsi contro il carbonchio? Potevasi trattare di un fatto esclusivamente locale, cioè, per esempio, di una distruzione del virus in loco, oppure di un qualsiasi impedimento alla diffusione di esso nell'organismo, senza che questo in realtà ne risentisse alcun effetto generale?

Era dunque importante vedere, per risolvere tale dubbio, se gli animali così immunizzati per la camera anteriore, presentassero un certo grado di resistenza rispetto alle inoculazioni del virus fatte per qualunque altra via, ad esempio per il sottocutaneo. A tal'uopo le cavie ed i conigli precedenti, che erano sopravvissuti alle ripetute inoculazione endoculari, vennero assoggettati alla inoculazione sottocutanea di una dose piccolissima, ma sicuramente letale, della cultura di carbonchio in brodo in 48 ore; in caso di sopravvivenza, si ripeteva l'inoculazione sottocutanea ancora una o più volte, con dosi via via maggiori.

TABELLA III

Inoculazioni di carbonchio nel sottocutaneo degli animali sopravvisuti della Tabella II.

N. d'ordine	I INOCULAZIONE			II INOCULAZIONE			III INOCULAZIONE			IV INOCULAZIONE			OSSERVAZIONI
	Data	Peso dell'animale	Quantità di coltura	Data	Peso dell'animale	Quantità di coltura	Data	Peso dell'animale	Quantità di coltura	Data	Peso dell'animale	Quantità di coltura	
							A — CAVIE						
1ª	16 febb.	513	$^1/_{50}$ cc.	4 marzo	540	$^1/_{30}$ cc.	15 marzo	600	$^1/_{20}$ cc.	28 marzo	607	$^1/_{10}$ cc.	
2ª	26 »	420	»	10 »	428	»	28 »	450	»	8 aprile	460	»	
3ª	2 marzo	360	$^1/_{40}$ cc.	20 »	385	$^1/_{20}$ cc.	1 aprile	400	»	12 »	421	»	Morta dopo 10 giorni per coc-
4ª	1 aprile	560	»	10 aprile	584	»	21 »	525	$^1/_{10}$ cc.	1 maggio	588	$^1/_5$ cc.	cidiosi diffusa.
5ª	20 »	450	$^1/_{20}$ cc.	30 »	465	»	12 magg.	480	»	20 »	488	»	
6ª	»	420	$^1/_{30}$ cc.	»	434	»	10 »	450	»	»	454	»	Morta dopo 14 giorni per coc-
7ª	20 marzo	588	$^1/_{40}$ cc.	2 aprile	565	$^1/_{30}$ cc.	14 aprile	570	»	22 aprile	581	»	cidiosi al fegato e milza.
							B — CONIGLI						
1º	16 febb.	1758	$^1/_{40}$ cc.	4 marzo	1790	$^1/_{20}$ cc.	15 marzo	1845	$^1/_{10}$ cc.	28 marzo	1880	$^1/_5$ cc.	
2º	25 »	1662	»	8 »	1670	»	20 »	1690	»	31 »	1701	»	
3º	5 marzo	1220	»	15 »	1238	»	27 »	1245	»	6 aprile	1258	»	
4º	10 »	1700	»	22 »	1722	»	1 aprile	1710	»	10 »	1722	$^1/_2$ cc.	Morto 82 ore dopo per cocci-
5º	15 »	1600	$^1/_{30}$ cc.	28 »	1790	»	6 »	1620	»	15 »	1770	»	diosi diffusa al fegato, milza
6º	15 aprile	1235	»	24 aprile	1320	$^1/_{10}$ cc.	1 magg.	1334	$^1/_5$ cc.	12 magg.	1351	»	e polmone.
7º	24 »	1200	»	2 magg.	1241	»	...	...	...	...	...	...	Morta 144 ore dopo per rottura del bulbo oculare.

La prima vaccinazione endoculare, dunque, non è solo l'esponente di un fatto locale; ma essa ha influenza su tutto l'organismo, per modo che gli animali si mostrano poi immunizzati anche contro l'introduzione del virus per la via naturalmente tanto suscettibile del tessuto sottocutaneo.

Qui è da notare, che quando la prima inoculazione sottocutanea è fatta con dose molto piccola

$$\left(\frac{1}{50} - \frac{1}{40} \text{ cc. per le cavie; } \frac{1}{40} - \frac{1}{30} \text{ cc. per i conigli}\right),$$

tutti gli animali resistono, mostrandosi poi capaci di ricevere impunemente quantità di virus gradatamente crescenti; fino a raggiungere quelle enormi di $\frac{1}{2}$ — 1 cc.

Quando invece la prima inoculazione sottocutanea è fatta con dose troppo forte, *una goccia* per esempio o poco meno, alcuni animali soccombono. Ciò dimostra che l'immunizzazione, una volta iniziata e ottenuta fino ad un certo grado con le inoculazioni endoculari, può essere rinforzata e spinta ad un grado altissimo mediante le successive inoculazioni sottocutanee.

Innanzi a questi risultati, non è fuor di luogo il ricordare come tutte le ricerche finora fatte per immunizzare i conigli e le cavie contro il carbonchio, stante l'estrema sensibilità di questi animali per il virus carbonchioso, non hanno approdato che a risultati o completamente negativi o dubbi ed incerti. Per quanto riguarda le cavie, anzi, è in generale ammessa l'opinione che una immunizzazione attiva non sia assolutamente possibile. (1)

In quanto ai conigli, le opinioni, così come i metodi ed i risultati delle esperienze fatte, sono stati finora difformi e contraddittori ; difatti mentre Roux Chamberland (2) già nel 1887 sarebbero riusciti a produrre un'immunizzazione rapida in questi animali, mediante il metodo delle inoculazioni preventive coi vaccini Pasteur, introducendone grandi quantità nelle vene, e recentemente Sobernheim avrebbe ottenuto lo stesso effetto anche con l'inoculazione sottocutanea di vaccini esattamente preparati e dosati, d'altra parte anche recentemente N. Mel-

---

(1) V. Sobernheim, *Uber active und passive Milzbrandimmunität.* Zeitsch. f. Hyg. u. Infekt 1898. XXV.

(2) *Immunisation des lapins au charbon.* Annales de l'Inst. Pasteur, 1898.

NIKOW-RASWEDENKOW (1) in una lunga serie di esperienze dimostrava che l'immunizzazione attiva dei conigli non dà risultati costanti con alcun metodo, che le inoculazioni endovenose dei vaccini Pasteur per lo più abbassono piuttosto che rinforzare la resistenza dei conigli al carbonchio, che i conigli vecchi qualche volta resistono anche ad un carbonchio virulento, e che infine anche per questi ultimi l' aver superato una volta l'infezione, non è indizio sufficiente per ritenere che non abbiano a morire in una seconda prova.

Comunque sia, è certo però, che neppure nei conigli è stata mai da alcuno tentata con successo l'immunizzazione, non già ricorrendo ai vaccini carbonchiosi o virus più o meno attenuati, ma direttamente e fin da principio avvalendosi del *carbonchio virulento*.

Tale impossibilità, del resto, risulta chiara dalle stesse esperienze di SOBERNHEIM (2), dalle quali si rileva che anche *un solo* o *pochi germi del carbonchio virulento* sono capaci di uccidere quasi tutti i conigli, ai quali vengono inoculati.

Se dunque con le inoculazioni endoculari ripetute di carbonchio virulento, conigli e cavie non solo non muoiono, ma s'immunizzano solidamente al carbonchio; ciò vuol dire che il virus carbonchioso penetrando per il sistema linfatico, subisce o induce nell'organismo modificazioni ben diverse da quelle, che si hanno quando sia qualunque altra la via di penetrazione. Il sistema linfatico assume per conseguenza una importanza speciale nella genesi dell' immunizzazione, importanza che merita di essere precisata e approfondita.

3.° MECCANISMO DELL'IMMUNIZZAZIONE.—Il primo quesito che si presenta nello studio di tale problema, è quello di sapere che cosa avviene del virus carbonchioso inoculato nella camera anteriore dell' occhio, in ciascuno dei due casi esaminati: cioè così quando gli animali sopravvivono, come quando soccombono alla inoculazione.

A questo scopo si prendono due lotti di animali, ognuno composto di otto o dieci cavie ed altrettanti conigli, e si inocula: agli animali del 1° lotto nell'occhio la *dose minima letale* della cultura di carbonchio in brodo di 48 ore (cioè, come si è stabilito innanzi, $\frac{1}{40}$ cc. per le cavie, e $\frac{1}{20}$ cc. per i conigli), ed agli animali del 2° lotto egualmente nell'occhio una *dose non*

(1) *Ueber künstliche Immunitat der Kaninchen gegen Milzbrand.* Zeitsch. f. Hygiene und Infectionsk; 1897, XXV, 225.

(2) Loc. cit.

letale della stessa coltura, $\left(\text{cioè } \frac{1}{50}\text{ cc. per le cavie e } \frac{1}{30}\text{ cc. per i conigli}\right)$. Indi si procede alla uccisione degli animali inoculati, con vario intervallo di tempo tra l'uno e l'altro, ma parallelamente per i due lotti, ed alla ricerca dei bacilli del carbonchio nell'organismo.

Gli animali venivano uccisi con un colpo sulla nuca, e precisamente nell'ordine che segue: un 1º immediatamente dopo l'inoculazione, un 2º dopo un'ora, un 3º dopo 6 ore, un 4º dopo 24 ore, e così di seguito di 24 in 24 ore fino alla morte per quelli inoculati con la dose minima letale: con lo stesso ordine fino al quinto giorno si procedeva per quelli inoculati con dose non letale, salvo che per questi, gli ultimi venivano uccisi dopo parecchio tempo, per determinare il tempo della scomparsa dei bacilli dall'organismo.

La tecnica adoperata per la ricerca dei bacilli nell'organismo mediante culture isolanti, per quanto concerne il modo di prelevare gl'innesti dai gangli linfatici, é stata descritta in principio di questo lavoro.

Qui aggiungeremo solo alcune particolarità. Da ogni animale si facevano sette innesti in agar, e quindi sette piastre isolanti, con materiale preso da questi diversi punti dell'organismo: camera anteriore, sangue, peritoneo, milza, gangli carotidei, gangli sottocutanei gangli mesenterici. Il materiale era attinto sempre con la stessa ansa di platino, e nella misura di cinque anse di *pappa* (milza, gangli), o di cinque anse di *liquido* (camera anteriore, sangue, peritoneo). Le piastre venivano esaminate sempre dopo 48 ore di dimora nel termostrato a 37.º

I risultati sono raccolti nelle seguenti tabelle:

TABELLA IV.

Animali uccisi in serie vario tempo dopo l'inoculazione nella camera anteriore della « dose minima letale » di carbonchio.

N. d'ordine	INTERVALLO tra inoculazione e uccisione	N°. DI COLONIE SVILUPPATESI NELLE PIASTRE						
		dalla camera anteriore	dai gangli carotidei	dai gangli sotto-cutanei	dai gangli mesenterici	dal peritoneo	dal sangue	dalla milza
	A. — Cavie.							
1	Immediatamente	200	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna
2	1 ora	190	4	»	»	»	»	»
3	6 ore	143	12	4	»	»	»	»
4	24 »	84	30	25	»	»	»	»
5	48 »	72	68	40	»	»	»	»
6	72 »	40	75	38	»	»	»	»
7	96 »	32	70	25	8	3	45	58
8	130 morte	74	104	59	40	45	1050	502
	B. — Conigli.							
1	Immediatamente	505	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna
2	1 ora	498	»	»	»	»	»	»
3	6 ore	494	8	1	»	»	»	»
4	24 »	470	81	33	»	»	»	»
5	48 »	473	104	45	»	»	»	»
6	72 »	394	152	28	3	1	4	3
7	96 »	200	184	40	32	12	13	34
8	137 morte	320	342	200	143	39	884	Innumerevoli

TABELLA V.

Animali uccisi in serie vario tempo dopo l' inoculazione nella camera anteriore di una « dose non letale « di carbonchio.

Numero d' ordine	INTERVALLO tra inoculazione e uccisione	N.° DI COLONIE SVILUPPATESI NELLE PIASTRE						
		dalla camera anteriore	dai gangli carotidei	dai gangli sottocutanei	dai gangli mesenterici	dal peritoneo	dal sangue	dalla milza
	A. — CAVIE.							
1	Immediatamente	150	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna
2	I ora	65	1	»	»	»	»	»
3	6 ore	50	15	»	»	»	»	»
4	24 »	42	50	2	»	»	»	»
5	48 »	38	55	17	»	»	»	»
6	48 »	24	20	22	»	»	»	»
7	96 »	13	14	6	»	»	»	»
8	130 »	3	10	4	»	»	»	»
9	192 »	1	8	Nessuna	»	»	»	»
10	288 »	Ness.	2	»	»	»	»	»
	B. — CONIGLI.							
1	Immediatament6	401	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna	Nessuna
2	1 ora	475	»	»	»	»	»	»
3	6 ore	385	19	»	»	»	»	»
4	24 «	487	88	24	»	»	»	»
5	48 »	258	102	35	»	»	»	»
6	72 »	210	100	10	»	»	»	»
7	96 »	180	103	16	»	»	»	»
8	120 »	130	80	12	»	»	»	»
9	192 »	11	17	3	»	»	»	»
10	288 »	Ness·	1	Nessuna	»	»	»	»

Dalle esperienze così condotte si possono dunque trarre le seguenti conclusioni :

1.° Negli animali (cavie e conigli) inoculati con *la dose minima letale*, i bacilli del carbonchio già poche ore dopo l'inoculazione endoculare passano nei gangli carotidei ed indi in quelli sottocutanei, ove, così nei primi come nei secondi, si arrestano per qualche tempo. Solo dopo il 3° o 4° giorno cominciano ad irrompere in tutti gli altri organi, nei quali poscia si moltiplicano ; e dopo circa altri 3 o 4 giorni determinano la morte.

Il ritardo della morte di questi animali sembra quindi che si debba ascrivere ad una duplice ragione ; in primo luogo al fatto che il virus compie una prima tappa nel sistema ganglionare linfatico, che ne impedisce per qualche tempo l'espansione; ed in secondo luogo ad una influenza *debilitante* che esso deve subire nel detto sistema ganglionare, per cui anche quando ne vien fuori ed invade altri organi, presenta una diminuzione della sua facoltà riproduttiva, specialmente nel sangue, e quindi un'attenuazione della sua virulenza.

2.° Quando l'inoculazione endoculare è fatta con *dose inferiore alla letale*, i bacilli si trovano egualmente poche ore dopo nei gangli carotidei, e dopo circa 24 ore anche nei sottocutanei, ma non vanno più oltre; essi restano in vita nei detti gangli per vari giorni, e poi sono quivi gradatamente uccisi, fino a scomparire del tutto dopo circa 12-15 giorni. La sopravvivenza quindi di questi animali e la consecutiva loro immunizzazione, evidentemente, dipende dal fatto che i gangli linfatici sono in grado di arrestare e mantenere in vita per alcuni giorni tutti i bacilli, che oltrepassano la camera anteriore dell'occhio; cosicchè il campo della lotta fra virus ed organismo si restringe in questo caso esclusivamente al sistema ganglionare linfatico.

Quanto alla camera anteriore dell'occhio, sede dell'inoculazione, non pare che essa abbia alcuna speciale influenza sia nel primo che nel secondo caso. Nel primo caso, cioè quando gli animali muoiono, i bacilli del carbonchio subiscono in essa una progressiva diminuzione di numero, però vi persistono in una certa quantità fino alla morte dell'animale; nel secondo caso la diminuzione progressiva dei bacilli, che si verifica in una misura alquanto più rapida, arriva fino alla scomparsa di essi, però solo tardivamente, e cioè appena qualche giorno prima della scomparsa totale dei bacilli anche dai gangli. Ma ciò non ha importanza per l'immunizzazione, poichè è dimostrato dalle esperienze di Perez che lo stesso effetto, cioè la localizzazione dei bacilli nei gangli, può ottenersi con la inoculazione di dosi non letali

di carbonchio *per la via cutanea mediante sfregamento*, cioè data egualmente la penetrazione esclusiva del virus nel sistema linfatico per una via diversa da quella della camera anteriore.

Ora limitata ogni influenza nella produzione dell'immunità al solo apparato ganglionare linfatico, è uopo ritenere che questo, nella sua lotta contro il virus, o metta in giuoco dei fattori suoi propri, diversi da quelli già noti nell'organismo (potere battericida, fagocitosi), oppure agisca esaltando questi ultimi di una speciale maniera.

Per raccogliere dei dati sperimentali, grazie ai quali si potesse rare un po' di luce su tale quistione, abbiamo proceduto in questo modo: abbiamo sottoposto alla immunizzazione nel modo anzidetto per la camera anteriore dell'occhio, una serie di animali (cavie e conigli), prendendo in esame le variazioni che per effetto del trattamento si verificassero nel potere battericida del sangue e nella che, miotassi, nonchè quelle relative al peso del corpo ed alla temperatura.

Ecco i risultati di queste indagini:

Vennero messi in esperimento quattro cavie e altrettanti conigli, ognuno sottoposto a quattro successive inoculazioni endoculari, con quantità crescenti, della coltura di carbonchio in brodo di 48 ore.

TABELLA VI.

Andamento del peso del corpo e della temperatura durante l'immunizzazione

DATA	CAVIA I		CAVIA II		CAVIA III		CAVIA IV	
	Peso gr.	Temper. C.o	Peso gr.	Temper. C.o	Peso gr.	Temper. C.o	Peso gr.	Temper. C.o
A. — CAVIE								
1ª *Inoculazione*								
Prima	310	38.2	362	38.4	650	38.	455	38.6
Dopo 1 giorno	295	38.5	335	38.6	585	38.5	380	37.7
» 2 giorni	295	38.0	330	38.1	615	38.0	360	37.5
» 3 »	295	38.3	350	38.5	625	38.2	350	37.9
» 4 »	300	38.0	360	38.6	605	38.1	355	38.0
» 5 »	300	37.9	365	38.3	625	38.6	365	38.0
» 6 »	303	37.6	371	38.1	675	38.2	370	38.1
» 7 »	300	37.5	380	38.0	670	38.1	370	38.4
» 8 »	310	38.3	390	38.5	610	38.3	385	38.1
» 9 »	315	38.1	400	38.2	600	38.4	380	38.3
» 10 »	317	38.0	395	38.1	585	38.1	395	37.7
» 11 »	328	37.9	401	38.0	625	38.4	415	37.8
2ª *Inoculazione*								
Prima	328	37.9	401	38. 0	655	38. 4	415	31. 8
Dopo 1 giorno	305	38.1	360	38. 4	570	38. 1	400	38. 1
» 2 giorni	298	38.3	365	38. 2	564	38. 7	393	38. 4
» 3 »	315	38.5	385	38. 6	554	39. 0	388	38. 6
» 4 »	310	38.4	370	38. 4	Morta per ferita della congiuntiva.		340	39. 2
» 5 »	300	38.7	350	38. 3	»		Morta per ferita della conginntiva.	
» 6 »	320	38.2	370	38. 2	»		»	
» 7 »	320	38,2	370	38. 1	»		»	

DATA	CAVIA I		CAVIA II		CAVIA III		CAVIA IV	
	Peso	Temper.	Peso	Temper.	Peso	Temper,	Peso	Temper.
Dopo 8 giorni	325	38. 1	365	38. 3	»		»	
» 9 »	325	38. 2	375	38. 2	»		»	
» 10 »	310	38. 4	380	38. 4	»		»	
» 11 »	390	38. 0	370	38. 1	»		»	
3ª Inoculazione								
Prima	290	38. 0	370	38. 1	»		»	
Dopo 1 giorno	320	38. 7	365	38. 3	»		»	
» 2 »	310	38. 4	360	33. 1	»		»	
» 3 »	310	38. 4	390	38. 4	»		»	
» 4 »	220	38. 4	390	38. 5	»		»	
» 5 »	325	38. 3	384	38. 2	»		»	
» 6 »	310	38. 5	380	38. 3	»		»	
» 7 »	320	38. 5	365	38. 3	»		»	
» 8 »	325	38. 2	360	38. 1	»		»	
» 9 »	328	38. 2	348	38. 2	»		»	
» 10 »	320	38. 1	250	38. 0	»		»	
» 11 »	300	38. 2	356	38. 1	»		»	
4ª Inoculazione								
Prima	270	38. 2	356	38. 1	»		»	
Dopo 1 giorno	272	38. 3	350	38. 2	»		»	
» 2 giorni	268	38. 1	345	38. 4	»		»	
» 3 »	270	38. 1	343	38. 1	»		»	
» 4 »	281	38. 0	355	38. 0	»		»	
» 5 »	285	38. 0	329	37. 9	»		»	
» 6 »	290	37. 9	361	38. 1	»		»	
» 7 »	295	37. 9	370	37. 7	»		»	
» 8 »	293	37. 7	384	38. 0	»		»	
» » 9	295	37. 6	380	38. 1	»		»	

DATA	CONIGLIO I		CONIGLIO II		CONIGLIO III		CONIGLIO IV	
	Peso	Temper.	Peso	Temper.	Peso	Temper.	Peso	Temper.
***B.* — Conigli**								
1.ª *Inoculazione*								
Prima	1670	38.1	1750	37.1	1930	38.2	2270	38.5
Dopo 1 giorno	1600	37.4	1650	37.5	1880	37.9	2215	38.9
» 2 »	1610	37.9	1680	37.7	1815	38	2130	39.4
» 3 »	1585	38.1	1695	37.2	1830	39.3	Morto 60 ore dopo con rottura del bulbo oculare.	
» 4 »	1595	38.2	1680	37.7	Morto 81 ore dopo con coccidiosi.		»	
» 5 »	1695	38.7	1695	38.4	»		»	
» 6 »	1700	38.9	1820	39	»		»	
» 2 »	1690	39.2	1850	38.1	»		»	
» 8 »	1650	40.2	1770	39.2	»		»	
» 9 »	1620	39.1	1670	38.2	»		»	
« 10 »	1645	39.5	1670	38.1	»		»	
2ª *Inoculazione*								
Prima	1645	39.5	1670	38.1	»		»	
Dopo 1 giorno	1640	38.6	1650	38.4	»		»	
» 2 »	1632	39	1634	38.2	»		»	
« 3 »	1640	38.7	1630	38.4	»		»	
» 4 »	1645	38.5	1655	38.6	»		»	
» 5 »	1655	38	1648	31.1	»		»	
» 6 »	1640	38.4	1674	38.1	»		»	
» 7 »	1638	38.6	1680	38.3	»		»	
» 8 »	1610	38.5	1625	38.1	»		»	
» 9 »	1600	38.1	1640	38	»		»	
» 10 »	1515	38.4	1662	38	»		»	

DATA	CONIGLIO I		CONIGLIO II		CONIGLIO III		CONIGLIO IV	
	Peso	Temper.	Peso	Temper.	Peso	Temper.	Peso	Temper.
				3.ª Inoculazione.				
Prima	1515	38.4	1662	58	»		»	
Dopo 1 giorno	1500	38.8	1644	38.3	»		»	
» 2 »	1500	38.5	1640	38.5	»		»	
» 3 »	1580	38.3	1648	38.2	»		»	
» 4 »	1585	38.2	1654	38.2	»		»	
» 5 »	1575	33.9	1670	38.1	»		»	
» 6 »	1580	38.2	1648	38.3	»		»	
» 7 »	1582	38.3	1690	38.2	»		»	
» 8 »	1570	38.5	1675	38	»		»	
				4.ª Inocolazione.				
Prima	1570	38.5	1675	38	»		»	
Dopo 1 giorno	1620	38.8	1670	38.2	»		»	
» 2 »	1600	39	1644	38.4	»		»	
» 3 »	1609	39.5	1655	38.4	»		»	
» 4 »	1650	39.1	1674	88.1	»		»	
» 5 »	1630	38.6	1680	38.1	»		»	
» 6 »	1604	38.8	1675	38	»		»	
» 7 »	1620	38.1	1682	37.9	»		»	
» 8 »	162g	38.1	1680	37.9	»		»	
» 9 »	1630	38	1684	38.1	»		»	

Per l' esame del *potere battericida del sangue* si è adoperato il metodo generalmente usato in tale ricerca.

TABELLA VII.

Saggio del potere battericida del sangue prima e dopo l'immunizzazione

NUMERO d'ordine	Prima dell'immunizzazione				Dopo l'immunizzazione			
	Immediatamente	Dopo 1/2 ora	Dopo 6 ore	Dopo 24 ore	Immediatamente	Dopo 1/2 ora	Dopo 6 ore	Dopo 24 ore
A. — Cavie								
Cavia I.	400	300	2500	Innumer.	560	390	160	5000
Cavia II	310	400	1380	»	435	322	201	1475
Cavia III. . . .	540	450	Innumer.	»	—	—	—	—
Cavia IV	600	520	»	»	—	—	—	—
B. — Conigli								
Coniglio I . . .	650	590	328	1480	600	488	202	375
Coniglio II. . .	700	606	6390	Innumer.	594	468	113	2140
Coniglio III. . .	721	677	540	3186	—	—	—	—
Coniglio IV. . .	590	480	141	Innumer.	—	—	—	—

In quanto alla *chemiotassi*, è noto com' essa sia negativa negli animali normali rispetto al carbonchio. Invece nelle due cavie e nei due conigli sopravvissuti alla immunizzazione, e nei quali si praticò tale ricerca mediante il metodo dei noti tubicini di vetro, parzialmente riempiti di coltura di carbonchio in brodo e quindi inoculati nel sottocutaneo, si ebbe per risultato: ora formazione di un grosso tappo leucocitico alla imboccatura del tubicino, ora penetrazione e parziale riempimento dell'interno di questo con leucociti, e disgregazione dei pochi bacilli rinvenuti al microscopio. In altri termini erano evidenti i segni di una chemiotassi in senso positivo.

Concludendo sui dati raccolti da queste esperienze fatte negli stessi animali prima e dopo e anche durante l'immunizzazione, si può stabilire:

1.° L'immunizzazione procede senza notevoli variazioni del peso del corpo e della temperatura degli animali. Nella 1ª inoculazione segue quasi costantemente una lieve diminuzione del peso, ed un aumento della temperatura, che non va al di là di un grado o di un grado e mezzo, ma nelle inoculazioni successive anche queste oscillazioni tendeno a scomparire. Ciò non ostante è necessario che tra una inoculazione e l'altra passino parecchi giorni, se non si vuole che l'animale soccomba per una tipica infezione carbonchiosa.

2.° Negli animali immunizzati notasi un aumento del potere battericida del sangue, ma non molto considerevole, e manifestantesi piuttosto con un'azione ostacolante lo sviluppo dei bacilli, anzichè con un effetto di distruzione più o meno intensa dei medesimi.

3.° Ad animale immunizzato si ha chemiotassi positiva alquanto pronunziata.

Quale sia l'importanza da attribuirsi a questi diversi fatti, nella produzione dell'immunità per la via linfatica, si potrà considerare meglio dopo avere esposto ciò che avviene nella immunizzazione con altri virus per questa medesima via.

II. Immunizzazione al Tifo

Per poter meglio chiarire e valutare la portata delle esperienze fatte col bacillo del carbonchio, era opportuno ripeterle con qualche altro microrganismo patogeno, il cui modo d' agire sull' organismo differisse da quello eminentemente infettivo e setticemico del germe carbonchioso. Abbiamo scelto il bacillo del tifo.

L'azione morbigena di questo corrisponde, com'è noto, molto più al quadro di un'intossicazione, che a quello di un'infezione, essendo limitato lo sviluppo del bacillo e poco espansivo il suo cammino nell'organismo; ma si tratta in fondo di un fenomeno misto, poichè il veleno specifico (una o più *toxoproteine*) è contenuto nel corpo bacillare, esso è quindi legato allo sviluppo del bacillo e non viene messo in libertà che con la morte e col disfacimento di questo. Abbiamo riprodotto con questo bacillo, salvo lievi varianti, tutta la serie delle precedenti esperienze.

1.° Determinazione della dose minima letale per la camera anteriore dell'occhio. — Il materiale di cui ci siamo serviti è stata la coltura di tifo in agar di 24 ore. Tale coltura proveniva dalla milza di un tifoso, ed era stata più volte saggiata con esito positivo mediante la reazione di Widal sul sangue di ammalati di tifo.

Prima di inocularla nella camera anteriore dell'occhio, ne fu de-

terminata la virulenza (stabilendone la dose letale minima) mediante inoculazioni per altre vie, cioè peritoneo e sottocutaneo, in cavie e conigli. All'uopo ci siamo serviti come istrumento misuratore di un'ansa di platino esattamente pesata alla bilancia e capace di 2 mg. della coltura in agar, e, come mestruo, della soluzione fisiologica sterilizzata di cloruro sodico in quantità non superiore ad 1 cc. per ogni inoculazione.

Trovammo che la dose letale minima nelle cavie di 250-300 gr. di peso era:

per il peritoneo. . . . mg. 0, 2
» sottocutaneo. . . . » 16,0

ed in conigli del peso da 800-1000 gr.:

per il peritoneo. . . . mg. 18,0
» sottocutaneo . . 23,0

Passando alle inoculazioni endoculari, malgrado che adoperassimo dosi molto superiori alle precedenti, non mai riuscimmo ad ottenere la morte degli animali.

Stante la capacità limitata della camera anteriore, per cui non era possibile introdurvi che pochissimi decimi di cc. di liquido, la quantità di coltura da emulsionarsi in questo non poteva essere spinta oltre un certo limite, compatibilmente col passaggio del materiale emulsionato attraverso il sottile ago della siringa.

La dose massima quindi che per tale via abbiamo potuto inoculare è stata di *50 mg.* per le cavie e *100 mg.* per i conigli; ma gli animali mostrarono di poter resistere a quantità di coltura anche molto maggiori di queste. Eppure la quantità massima adoperata per le cavie era tale da rappresentare, se inoculata nel peritoneo, *duecento cinquanta volte* la dose minima letale!

Sembra adunque doversi confermare anche rispetto al bacillo del tifo, il fatto messo in luce per il virus carbonchioso: che, cioè, le vie linfatiche ed in specie il sistema ganglionare linfatico sono dotati di fronte ai virus di un potere di resistenza molto superiore a quello di tutte le altre parti dell'organismo, e quindi debbono concorrere alla protezione e difesa di questo in un grado notevolmente alto.

2.° IMMUNIZZAZIONE. — Negli animali inoculati nella camera anteriore una sola volta, con quantità variabili di coltura di tifo, abbiamo poi saggiato se vi fosse immunizzazione generale, inoculando rispettivamente nel peritoneo e nel sottocutaneo dosi letali di virus per una o più volte, col risultato che si rileva dalle seguenti tabelle:

TABELLA VIII.

Prima inoculazione nella camera anteriore e consecutive nel peritoneo

N. d'ordine	I Inoculazione		II Inoculazione		III Inoculazione		Esito
	Data	Quantità	Data	Quantità	Data	Quantità	
			A. — CAVIE				
1ª	25 novem.	18 mg.	27 dicem.	$^2/_5$ mg.	9 genn.	8 mg.	Vive
2ª	16 »	26 »	» »	$^3/_5$ »	» »	12 »	»
3ª	1 dicemb.	22 »	» »	1 »	» »	22 »	»
4ª	25 novem.	28 »	» »	2 »	» »	15 »	»
5ª	16 »	26 »	» »	2 »	10 »	30 »	»
6ª	3 dicemb.	38 »	1 genn.	3 »	29 »	34 »	»
			B. — CONIGLI				
1°	3 dicemb.	45 mg.	1 genn.	14 mg.	30 genn.	30 mg.	Vive
2°	» »	85 »	3 »	24 »	4 febbr.	50 »	»
3°	» »	» »	» »	24 »	» »	60 »	»
4°	6 »	75 »	6 »	26 »	8 »	65 »	»

TABELLA IX.

Prima inoculazione nella camera anteriore e consecutive nel sottocutaneo

N. d'ordine	I Inoculazione		II Inoculazione		III Inoculazione		Esito
	Data	Quantità	Data	Quantità	Data	Quantità	
			A. — CAVIE				
1ª	28 novemb.	19 magg.	15 dicemb.	14 magg.	16 gennaio	26 magg.	Vive
2ª	» »	28 »	» »	16 »	18 »	28 »	»
3ª	29 »	35 »	18 »	20 »	24 »	30 »	»
4ª	» »	48 »	22 gennaio	» »	12 febbraio	32 »	»
			B. — CONIGLI				
1°	29 dicemb.	60 magg.	22 gennaio	16 magg.	12 febbraio	26 magg.	Vive
2°	1 febbraio	75 »	2 marzo	26 »	29 marzo	38 »	»
3°	» »	90 »	» »	30 »	» »	45 »	»

Da ciò risulta, dunque, che per la via ganglionare linfatica si può ottenere una immunizzazione generale dell'organismo all'infezione tifosa, la quale va segnalata per la rapidità ed intensità con cui si stabilisce, sia perchè compare già dopo una sola inoculazione endoculare, sia perchè si manifesta sin da principio di un grado molto elevato.

3.° MECCANISMO. — Abbiamo fatto inoltre in vari animali l'esame della temperatura e del peso del corpo durante l'immunizzazione per la camera anteriore, e così pure il saggio del potere battericida del sangue prima e dopo l'immunizzazione stessa. Non si è ripetuta qui, come per il carbonchio, la prova della chemiotassi, essendo noto che questa si presenta già positiva negli animali normali; nè è sembrato necessario di rifare le esperienze circa la diffusione del bacillo, e la durata vitale dello stesso nei vari organi, rilevandosi tali dati con sufficiente esattezza nelle esperienze già fatte da Perez.

In tutti gli animali si fece una sola inoculazione endoculare, secondo il massimo di capacità della camera anteriore, cioè nella dose di *50 mg.* per le cavie e *100 mg.* per i conigli; dopo la quale si procedette ai varî esami sopra mentovati. Per la tecnica usata in questi esami, veggasi quanto fu detto a proposito del carbonchio.

TABELLA X.

Variazioni della temperatura e del peso dèl corpo durante l'immunizzazione

A. — CAVIE

DATA	CAVIA I		CAVIA II		CAVIA III	
	Peso gr.	Temperat. C.o	Peso gr.	Temperat, C.o	Peso gr.	Temperat. C.o
Prima	622	38.2	655	38	350	38.6
Dopo 1 giorno	570	39	580	39	300	39.6
» 2 »	565	39.4	582	39.2	270	39.6
» 3 »	555	38.8	592	38.6	275	39.9
» 4 »	560	37.9	592	38.6	260	39
» 5 »	552	40.4	545	38.3	275	38.5
» 6 »	608	38.2	622	38.4	280	38.2
» 7 »	615	38.5	635	38.2	270	38.6
» 8 »	625	38	635	38.1	290	38.1
» 9 »	613	38.2	615	38.2	290	38.1
» 10 »	660	38.5	645	38.3	298	38
» 11 »	695	38.8	675	38.5	300	38
» 12 »	680	38.5	643	38.3	310	38.2
» 13 »	690	38.2	655	38	321	38.1
» 14 »	660	38	625	38	320	38.1

B. — CONIGLI

DATA	CONIGLIO I		CONIGLIO II		CONIGLIO III	
	Peso	Temperat.	Peso	Temperat.	Peso	Temperat.
Prima	1205	38.9	1250	38	1150	38
Dopo 1 giorno	1170	39.9	1200	39	1141	39
» 2 »	1197	36.9	1257	38.8	1100	39.5
» 3 »	1187	38.6	1242	39.1	1090	39.3
» 4 »	1200	38	1233	38.8	960	39.4
» 5 »	1192	37.9	1235	37.8	950	39.5
» 6 »	1215	38.2	1202	39.2	970	39.3
» 7 »	1155	39	1260	38.1	985	39.6
» 8 »	1118	39.6	1238	37.7	950	39
» 9 »	1150	39.6	1245	37.8	965	39.1
» 10 »	1120	39.3	1235	37.9	970	39
» 11 »	1023	39	1252	37.6	980	38.5
» 12 »	990	37.6	1260	37.7	980	38.2
» 13 »	994	37.9	1260	38	995	38.1
» 14 «	1160	37.8	1285	38	1001	38

TABELLA XI.

Variazioni del potere battericida del sangue in seguito all'immunizzazione.

NUMERO d' ordine	Prima dell'immunizzazione				Dopo l'immunizzazione			
	Immedia-tamente	Dopo 1/2 ora	Dopo 6 ore	Dopo 24 ore	Immedia tamente	Dopo 1/2 ora	Dopo 6 ore	Dopo 24 ore
A. — CAVIE.								
Cavia I. . .	400	300	225	Innum.	275	110	ness.	nessuna
Cavia II. . .	240	200	250	2010	304	281	14	22
Cavia III . .	300	180	20	9000	380	202	16	100
B. — CONIGLI.								
Coniglio I. .	340	1260	3000	5000	384	290	103	224
Coniglio II .	350	225	Innum	Innum.	406	374	108	3000
Coniglio III.	345	220	40	1050	300	209	10	103

Da queste esperienze, risulta che anche per il tifo, analogamente a quanto si è visto per il carbonchio, l' immunizzazione per la via linfatica induce negli animali una reazione generale che si rivela con la diminuzione del peso del corpo, con l' innalzamento della temperatura, con l'aumento del potere battericida del sangue. Le variazioni relative al peso alla temperatura durano per il tifo più a lungo, che non per il carbonchio; ma similmente come nella immunizzazione carbonchiosa, esse non sono in generale molto rilevanti, come non è rilevante l'aumento del potere battericida, sopratutto ove si pensi agli effetti che si hanno nella immunizzazione tifica praticata per altre vie (peritoneo ad esempio), e si rifletta inoltre che qui, per la camera anteriore dell'occhio, un'immunità di alto grado è stata raggiunta con *una sola inoculazione di una dose fortissima di virus*.

III. — Immunizzazione alla tossina difterica.

Nelle esperienze col virus difterico si partì dal concetto che, trattandosi di un virus ad azione esclusivamente tossica, era possibile togliere di mezzo ogni partecipazione diretta dell' agente vivo, inoculando nella camera anteriore dell'occhio il solo prodotto tossico dello stesso.

Quale sarebbe, in questo terzo caso, il modo di comportarsi del sistema gaglionare linfatico?

Preparammo all'uopo una certa quantità di tossina difterica col metodo generalmente usato, mediante filtrazione di colture molto attive di difterite ottenute in brodo Spronk, ed aggiunta al liquido filtrato del mezzo per cento di fenolo.

La tossicità di tale liquido fu innanzi tutto determinata per la via sottocutanea, in cavie e conigli, e si ebbero i seguenti valori riferibili alla dose minima letale:

nelle cavie. . . . . $\frac{1}{50}$ cc.

nei conigli. . . . . . $\frac{1}{30}$ cc.

L'inoculazione invece dello stesso liquido nella camera anteriore dell'occhio diede, per la dose minima letale, questi altri valori:

nelle cavie. . . . . $\frac{1}{20}$ cc.

nei conigli. . . . . $\frac{1}{15}$ cc.

Si rileva da ciò che, per la via linfatica, gli animali possono

resistere ad una dose di tossina maggiore circa del doppio di quella che è tollerabile per la via sottocutanea. È quindi da conchiudere, anche riguardo ai batteri esclusivamente tossici, come il bacillo della difterite, che l'organismo possiede naturalmente nel suo sistema ganglionare linfatico un presidio superiore agli altri, di cui esso è fornito.

Riguardo agli effetti immunizzanti delle inoculazioni subletali di tossina nella camera anteriore, abbiamo proceduto ad una lunga serie di esperienze nelle cavie e nei conigli, inoculando dapprima dosi ripetute e crescenti di tossina nell'occhio, e poi saggiando l'immunità per la via sottocutanea, come si vede nella tabella seguente:

TABELLA XII.

Prime inoculazioni nella camera anteriore, ultima nel sottocutaneo.

N. d'ordine	I INOCULAZIONE			II INOCULAZIONE			III INOCULAZIONE			IV INOCULAZIONE			Esito
	Data	Peso	Quantità	Data	Peso	Quantità	Data	Peso	Quantità	Data	Peso	Quantità	
							A. — CAVIE.						
1ª	28 marzo	405	1/40 cc.	5 aprile	410	1/20 cc.	15 aprile	320	1/10 cc.	23 aprile	300	1/50 cc.	+ 86 ore
2ª	1 aprile	225	1/30 cc.	9 »	230	»	»	260	»	»	280	»	+ 70 »
3ª	5 »	235	»	15 »	210	»	23 »	220	»	2 maggio	240	1/40 cc.	+ 28 »
4ª	6 »	220	»	»	220	»	»	230	»	»	240	1/50 cc.	+ 64 »
5ª	11 »	160	»	17 »	215	»	24 »	220	»	»	245	»	+ 81 »
6ª	»	180	»	»	205	»	»	235	»	»	250	»	+ 60 »
7ª	»	235	»	»	280	»	»	300	»	»	245	1/40 cc.	+ 53 »
8ª	»	260	»	»	320	»	»	330	»	»	380	»	+ 50 »
9ª	»	160	»	»	105	»	»	230	»	»	255	»	+ 46 »
10ª	»	155	»	»	180	»	»	165	»	»	206	»	+ 56 »
							B. — CONIGLI.						
1°	22 marzo	1440	1/20 cc.	29 marzo	1577	1/10 cc.	5 aprile	1280	1/10 cc.	15 aprile	1340	1/30 cc.	+ 82 ore
2°	30 »	955	»	5 aprile	975	»	15 »	1000	»	23 »	1150	1/10 cc.	+ 60 »
3°	»	875	»	»	924	»	»	978	»	»	1005	»	+ 52 »
4°	5 aprile	870	»	15 »	990	»	23 »	1170	»	29 »	1185	1/10 cc.	+ 109 »
5°	12 »	1200	»	39 »	1330	»	25 »	1341	»	1 maggio	1354	»	+ 116 »
6°	»	1105	»	»	1125	»	»	1148	»	»	1154	1/30 cc.	+ 180 »

Orbene, da queste esperienze risulta che è bensì possibile di assuefare gli animali a tollerare per la camera anteriore dosi letali di tossina difterica, cioè di ottenere un certo grado d'immunizzazione in un tempo relativamente breve e in animali suscettibilissimi, ma non si è autorizzati a ritenere, almeno nei limiti delle esperienze fatte, che in questo modo si possa raggiungere una immunizzazione generale tale, da preservare l'organismo contro la penetrazione di dosi letali per una via diversa. Difatti nessuno degli animali è sopravvissuto alla prova di controllo, e solamente qualcuno è morto con un notevole ritardo.

È vero che si tratta di animali molto sensibili alla tossina difterica, e la cui immunizzazione attiva per qualunque via è estremamente difficile. Ma è pur vero che, considerando i risultati brillanti ottenuti con un'altra immunizzazione, altrettanto se non maggiormente ardua, qual'è e quella delle cavie al carbonchio, non si potrebbe in modo assoluto attribuire l'insuccesso incontrato nell'immunizzazione antidifterica a ragioni di ordine tanto generale; sibbene è da pensare piuttosto ad una eventuale diversità nel modo di comportarsi del sistema ganglionare linfatico rispetto ai batteri patogeni, secondo che questi agiscono in una maniera eminentemente tossica, come il bacillo della difterite, oppure in una maniera eminentemente infettiva o mista, come il bacillo del carbonchio e quello del tifo. Ma le ricerche su quest'ultimo punto meritano di essere continuate, e, prima di venire ad una conclusione, sarà bene ripeterle anche con qualche altra tossina batterica analoga, ad esempio quella del tetano.

Conclusioni generali.

Le nostre ricerche sono lungi dall'avere risoluto in maniera esauriente l'argomento preso a trattare; alcuni punti richiedono di essere confermati o più largamente illustrati, altri si presentano ancora avvolti dal buio; ma nel loro insieme esse dischiudono alla patologia microbica un campo che si può dire nuovo, o almeno non esplorato, cioè lo studio della immunità naturale ed acquisita in rapporto al sistema ganglionare linfatico.

Sopratutto esse acquistano una maggiore significazione quando sieno considerate unitamente alle ricerche precedenti di Perez, mosse da unico concetto direttivo, e riguardanti il modo di comportarsi del sistema ganglionare linfatico rispetto ai microrganismi sia allo stato normale, sia nelle infezioni, sotto due altri importanti rapporti: quel-

lo, cioè, del parassitismo microbico latente, e quello dell'attenuazione degli agenti morbigeni nell' interno dell' organismo.

L'insieme dei risultati ottenuti in questo campo, fin'oggi, è veramente tale da deporre per un complesso di attribuzioni e di influenze tutte proprie, speciali, inerenti alla funzionalità dei gangli linfatici nelle molteplici e multiformi fasi del conflitto fra germi patogeni ed organismo animale.

Limitandoci ai risultati ben assodati che emergono dalle presenti ricerche, è evidente che si possono formulare le seguenti conclusioni generali :

1° Il sistema ganglionare linfatico è dotato di un grado di resistenza naturale ai virus (carbonchio, tifo, tossina difterica), superiore a quello di cui si mostrano forniti gli altri organi o tessuti del corpo animale.

2° Al sistema ganglionare linfatico devesi riconoscere una grande influenza nella produzione dell'immunità.

Per mezzo di esso è possibile realizzare l'immunizzazione al carbonchio delle cavie, che non è altrimenti attuabile, e quella dei conigli, che difficilmente si raggiunge per altre vie; come pure l' immunizzazione di entrambo queste specie animali all'infezione tifosa, in maniera così rapida ed intensa, come non si ha per nessun'altra via.

Appare invece assai difficile ottenere in questi stessi animali una considerevole immunizzazione alla tossina difterica.

3° Il meccanismo dell'immunizzazione per mezzo dei gangli linfatici risiede solo in parte in una reazione generale dei noti poteri difensivi dell'organismo (fagocitosi, potere battericida), i quali fattori presentano mutamenti che non sono proporzionati alla rapidità ed intensità dell'azione immunizzante, ma deve annidarsi in parte altresì nei gangli stessi, in proprietà bio-chimiche speciali del loro funzionamento.

4° Grazie a questa considerevole facoltà immunizzatrice dei gangli linfatici, per cui essi, sotto l'influenza di germi patogeni annidantisi nel loro stroma conferiscono facilmente l' immunità a tutto l'organismo, è possibile spiegare :

a) le immunità a varie malattie infettive che si acquistano quasi insensibilmente nel corso della vita, per effetto cioè di quei batteri patogeni che allo stato normale, superate le barriere tegumentarie dell'organismo, sono arrestati e conservano la loro vitalità per più o meno tempo nei gangli linfatici;

b) e una partecipazione del sistema ganglionare a quella immunità che segue alla guarigione di varie malattie infettive, conoscendosi che in questo caso, come dimostrarono le ricerche di PEREZ, i relativi batteri patogeni persistono ancora vitali per parecchio tempo nei gangli linfatici, quando sono scomparsi da tutte le altre parti dell'organismo.